



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                  |                                                                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | δ 15Nを利用したダイズにおける窒素固定能の推定                                                         |
| Author(s)        | 浦山, 勝                                                                             |
| Description      | 研究・技術発表                                                                           |
| Citation         | 北海道大学大学院農学研究科・農学部技術部研究・技術報告, 8, 3-10                                              |
| Issue Date       | 2001-03                                                                           |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/35406">https://hdl.handle.net/2115/35406</a> |
| Type             | departmental bulletin paper                                                       |
| File Information | 8_p3-10.pdf                                                                       |



## $\delta^{15}\text{N}$ を利用したダイズにおける 窒素固定能の推定

生物資源生産学専攻・作物生産生物学講座 浦山 勝

(作物・分析系 共同利用班)

### はじめに

マメ科植物は根に瘤状の根粒を形成し、この根粒が空気中に約78%存在している窒素ガス( $\text{N}_2$ )を固定していることはよく知られている。マメ科植物では、根粒は宿主(植物)から栄養をもらい根粒自身の成長に利用し、宿主は根粒が固定した窒素を利用することから、この関係は共生窒素固定系といわれている。

また、このほかの窒素固定系として単独で窒素固定をする単生窒素固定系、植物の根圏や葉圏で植物と窒素固定菌との間にある共同窒素固定系が最近明らかにされている。

ダイズは北海道畑作の重要な畑作物であり、その窒素同化は根粒による窒素固定の他に、肥料窒素および土壌中の有機物の分解によって生成する無機態窒素吸収に依存する。

ダイズは子実生産のために多量の窒素が必要とされ、子実100kg生産するのに7~9kgの窒素が必要とされる。すなわちヘクタールあたり4tの高い子実収量を得ようとすれば280~360kgに達する多量の窒素量が必要である。この多量の窒素要求に対して、施肥窒素や土壌中の無機態窒素濃度を高めることは経済的あるいは技術的に非常に難しいといわれており、根粒の窒素固定を高めることが重要であると指摘されている。

根粒の窒素固定能の評価として様々な測定法が提言されているが、窒素(N)に

は $^{14}\text{N}$ と $^{15}\text{N}$ の安定同位体があり、空中窒素と土壌窒素の安定同位体の自然存在比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) が大きく異なることから、植物体中の窒素の  $\delta^{15}\text{N}$  を求めることにより空中窒素と無機態窒素の由来を計算して、根粒窒素固定能の評価法として利用することが可能である。近年同位体質量分析計の発達にともない、自然存在比を微量な試料で比較的簡単に精度よく測定することが可能になった。

昨今、環境と調和した低投入持続的農業が提言されており、都市型畜産農家がかかえている問題の糞尿処理があり解決策として、畑に投入し有効利用しようという意見がある。そこで鶏、牛、豚、馬由来の堆肥および生ゴミコンポストを施与した有機物施与処理、および化学肥料処理でダイズを栽培し、土壌中窒素源が空中窒素固定能にどのように影響するかを安定同位体法により調査した。

## 実験方法

### 1) 栽培方法

北海道大学附属農場圃場にユキムスメ（枝豆用品種）を5月25日に播種した。

栽植密度はダイズの標準栽植密度の  $60 \times 20 \text{ cm}$  ( $8.3 \text{ 株/m}^2$ ) 1株に3粒播種し、生育途中で間引きし1株2本立ての  $\text{m}^2$  当たり16.7本とした。出芽時の鳥による食害をさけるために、播種後直ちに防鳥網を張った。

処理として無窒素 (0 N)、化学肥料 (硫安)  $20 \text{ kg}$  (20 N)、鶏糞、牛糞、豚糞、馬糞、生ゴミコンポストを分析値に基づいて窒素量としてヘクタールあたり  $100 \text{ kg}$  になるように施与し、施与後ロータリーで深さ約  $12 \text{ cm}$  に耕耘し土壌と混和させた。なお、鶏糞は附属農場より生状態で入手し網室で雨に当たらないように約2週間天日で乾燥させた。1区面積  $5 \times 5 \text{ m}$  の2反復で行い、リン、カリウムは各処理区共通でヘクタールあたり  $\text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{K}_2\text{O}$  として  $100 \text{ kg}$  を施肥した。窒素肥料および有機物の窒素含有率、施与量の処理は表1に示した。なお、有機物の窒素分析は  $\text{NO}_3$  も合わせて測定できるサリチル硫酸で湿式灰化後マイクロケルダール法によって行った。生育期間中の除草、農薬散

布などは慣行法に従った。

表1 窒素施与処理および有機物の窒素含有率

| 処 理      | N含有率*<br>(%) | 水分<br>(%) | N施肥量<br>kg/ha | 施与量<br>ton/ha |
|----------|--------------|-----------|---------------|---------------|
| 無 窒 素    | —            | —         | —             | —             |
| 化学肥料(硫安) | 21.0         | —         | 20            | 0.10          |
| 乾 燥 鶏 糞  | 2.78         | 13.1      | 100           | 4.14          |
| 牛 糞 堆 肥  | 2.37         | 78.2      | 100           | 19.4          |
| 豚 糞 堆 肥  | 2.50         | 72.0      | 100           | 14.3          |
| 馬 糞 堆 肥  | 2.81         | 77.9      | 100           | 16.1          |
| 生ゴミコンポスト | 2.51         | 12.9      | 100           | 4.57          |

\*N 含有率は絶乾表示 ただし硫安は除く

## 2) 試料採取方法

試料採取は7月24日、8月7日、8月22日の2週間おきに3回行った。処理区の中庸な生育場所より5株を選び、地際より地上部を切り取り茎を水道水で水洗後、各種形態を測定し通風乾燥機で80℃、48時間乾燥後に秤量を行い地上部乾物重とした。9月26日に20株採取し、収量および収量構成要素を調査した。

## 3) 植物体分析方法

秤量した乾物試料を微粉砕し、窒素は湿式灰化後ミクロケルダール法で、安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) は広島大学大学院生物圏科学研究科・植物栄養学研究室において全自動窒素・炭素同位体質量分析計 (DELTA puls : Finnigan 社製) を用い分析した。

安定同位体の自然存在比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) の計算は次式に従った。

$$\delta^{15}\text{N} = \left[ \frac{\text{試料の R}}{\text{基準物質の R}} - 1 \right] \times 1000 (\text{‰})$$

Rは $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ 比、基準物質は大気の $\text{N}_2$ とした

## 結果と考察

### 1) 生育経過と各種形態および乾物重

2000年は春先の天候不順により播種が例年より約10日遅れたが、その後の生育は順調であった（表2）。生ゴミコンポスト区は両反復区ともタネバエの害がひどく、6月12日に再度播種したので実験結果は参考程度である。

表2 各種形態および地上部乾物重

| 処 理      | 莖長   | 葉数   | 分枝数 | 莢数   | 乾物重(g/ m <sup>2</sup> ) |     |     | 計   |
|----------|------|------|-----|------|-------------------------|-----|-----|-----|
|          | cm   | ／個体  | ／個体 | ／個体  | 莖                       | 葉   | 莢   |     |
| 7月24日    |      |      |     |      |                         |     |     |     |
| 無 窒 素    | 43.7 | 9.0  | 4.7 | —    | 67                      | 66  | —   | 134 |
| 化学肥料(硫安) | 45.4 | 9.0  | 6.6 | —    | 85                      | 81  | —   | 165 |
| 乾 燥 鶏 糞  | 46.6 | 9.4  | 6.0 | —    | 98                      | 94  | —   | 192 |
| 牛 糞 堆 肥  | 44.6 | 8.8  | 6.6 | —    | 91                      | 91  | —   | 181 |
| 豚 糞 堆 肥  | 41.2 | 8.6  | 5.9 | —    | 73                      | 72  | —   | 144 |
| 馬 糞 堆 肥  | 40.3 | 8.8  | 6.6 | —    | 80                      | 83  | —   | 163 |
| 生ゴミコンポスト | —    | —    | —   | —    | —                       | —   | —   | —   |
| 8月7日     |      |      |     |      |                         |     |     |     |
| 無 窒 素    | 47.0 | 10.6 | 5.6 | 34.0 | 173                     | 142 | 53  | 368 |
| 化学肥料(硫安) | 46.6 | 10.6 | 5.2 | 39.3 | 179                     | 151 | 72  | 403 |
| 乾 燥 鶏 糞  | 51.5 | 11.8 | 5.6 | 45.6 | 205                     | 169 | 79  | 453 |
| 牛 糞 堆 肥  | 48.7 | 10.7 | 6.3 | 42.8 | 222                     | 189 | 76  | 487 |
| 豚 糞 堆 肥  | 43.8 | 10.4 | 5.3 | 48.7 | 180                     | 159 | 75  | 413 |
| 馬 糞 堆 肥  | 41.3 | 10.3 | 5.8 | 47.7 | 176                     | 159 | 64  | 399 |
| 生ゴミコンポスト | 47.4 | 10.0 | 4.3 | —    | 119                     | 107 | —   | 227 |
| 8月22日    |      |      |     |      |                         |     |     |     |
| 無 窒 素    | 48.4 | —    | 4.9 | 33.8 | 185                     | 140 | 256 | 581 |
| 化学肥料(硫安) | 50.7 | —    | 5.2 | 36.3 | 232                     | 173 | 306 | 711 |
| 乾 燥 鶏 糞  | 52.5 | —    | 5.3 | 36.8 | 219                     | 166 | 294 | 679 |
| 牛 糞 堆 肥  | 43.5 | —    | 6.6 | 40.8 | 194                     | 163 | 302 | 659 |
| 豚 糞 堆 肥  | 43.9 | —    | 6.6 | 40.6 | 199                     | 158 | 287 | 644 |
| 馬 糞 堆 肥  | 37.1 | —    | 5.3 | 37.3 | 207                     | 178 | 320 | 705 |
| 生ゴミコンポスト | 50.5 | —    | 3.5 | 36.0 | 175                     | 124 | 100 | 399 |

7月24日の試料採取時の乾物重は無窒素区で他処理区より小さかった。無窒素区では窒素が施肥されておらず、窒素の供給が土壌窒素と根粒に依存していたために初期生育が遅かった。他処理区には形態、乾物重ともに顕著な差はみられなかった。8月7日、8月22日の採取時では形態に顕著な差はみられ

ず、初期生育が遅く乾物重の小さかった無窒素区と他処理区との差は小さくなった。これは根粒活性が高まったためと考えた。

## 2) 収量および収量構成要素

収量は北海道の平均的収量であった。馬糞区がヘクタール当たり4 tの収量を示したが、他処理と顕著な収量差ではなかった(表3)。収量構成要素にも処理間で顕著な差はなかった。収量および収量構成要素ともに処理間差は乾物重と同様の傾向を示し、生育日数すなわち収穫時期にも処理間の差は認められなかった。

表3 収穫期の子実収量および収量構成要素

| 処 理      | 子実収量*               | 100粒重* | 莢数                  | 一莢粒数 |
|----------|---------------------|--------|---------------------|------|
|          | (g/m <sup>2</sup> ) | (g)    | ( /m <sup>2</sup> ) |      |
| 無 窒 素    | 376                 | 34.9   | 563                 | 1.92 |
| 化学肥料(硫安) | 384                 | 36.2   | 605                 | 1.75 |
| 乾 燥 鶏 糞  | 361                 | 32.2   | 613                 | 1.83 |
| 牛 糞 堆 肥  | 397                 | 34.5   | 680                 | 1.70 |
| 豚 糞 堆 肥  | 383                 | 35.5   | 676                 | 1.60 |
| 馬 糞 堆 肥  | 401                 | 37.1   | 622                 | 1.75 |
| 生ゴミコンポスト | 346                 | 34.7   | 599                 | 1.66 |

\*水分15%表示

## 3) 地上部窒素含有率および窒素集積量、 $\delta^{15}\text{N}$

地上部窒素含有率、集積量ともに採取時における処理間の顕著な差はなかった(表4)。 $\delta^{15}\text{N}$ は7月24日において鶏糞区で+6.20、次いで豚糞区が+5.28と高く、無窒素区で+1.63、化学肥料区で+1.89と低かった。8月7日は鶏糞区、豚糞区で+5.17、+4.02と高く無窒素区、化学肥料区で+1.36、+1.60と低かった。馬糞区は7月24日採取時の+4.55から8月7日で+1.70と顕著に低下した。 $\delta^{15}\text{N}$ はいずれの生育時期とも他処理区より鶏糞区で顕著に高かった(図1)。

表4 植物体窒素含有率、窒素集積量および $\delta^{15}\text{N}$

| 処 理      | N含有率<br>(%) | N集積量<br>(g/m <sup>2</sup> ) | $\delta^{15}\text{N}$<br>(‰) |
|----------|-------------|-----------------------------|------------------------------|
| 7月24日    |             |                             |                              |
| 無 窒 素    | 3.30        | 4.42                        | +1.63                        |
| 化学肥料(硫安) | 3.56        | 5.88                        | +1.89                        |
| 乾 燥 鶏 糞  | 3.16        | 6.02                        | +6.20                        |
| 牛 糞 堆 肥  | 3.31        | 6.03                        | +4.39                        |
| 豚 糞 堆 肥  | 3.17        | 4.63                        | +5.28                        |
| 馬 糞 堆 肥  | 3.47        | 5.68                        | +4.55                        |
| 生ゴミコンポスト | —           | —                           | —                            |
| 8月7日     |             |                             |                              |
| 無 窒 素    | 2.74        | 10.1                        | +1.36                        |
| 化学肥料(硫安) | 3.46        | 13.9                        | +1.60                        |
| 乾 燥 鶏 糞  | 2.77        | 12.6                        | +5.17                        |
| 牛 糞 堆 肥  | 2.71        | 13.2                        | +3.62                        |
| 豚 糞 堆 肥  | 3.28        | 13.7                        | +4.02                        |
| 馬 糞 堆 肥  | 2.82        | 11.3                        | +1.70                        |
| 生ゴミコンポスト | 3.26        | 7.4                         | +3.92                        |
| 8月22日    |             |                             |                              |
| 無 窒 素    | 3.05        | 17.9                        | +0.47                        |
| 化学肥料(硫安) | 3.17        | 22.5                        | +1.21                        |
| 乾 燥 鶏 糞  | 2.87        | 19.6                        | +4.23                        |
| 牛 糞 堆 肥  | 3.18        | 20.9                        | +2.14                        |
| 豚 糞 堆 肥  | 3.06        | 19.4                        | +1.70                        |
| 馬 糞 堆 肥  | 3.12        | 22.0                        | +1.29                        |
| 生ゴミコンポスト | 3.22        | 12.8                        | +2.90                        |

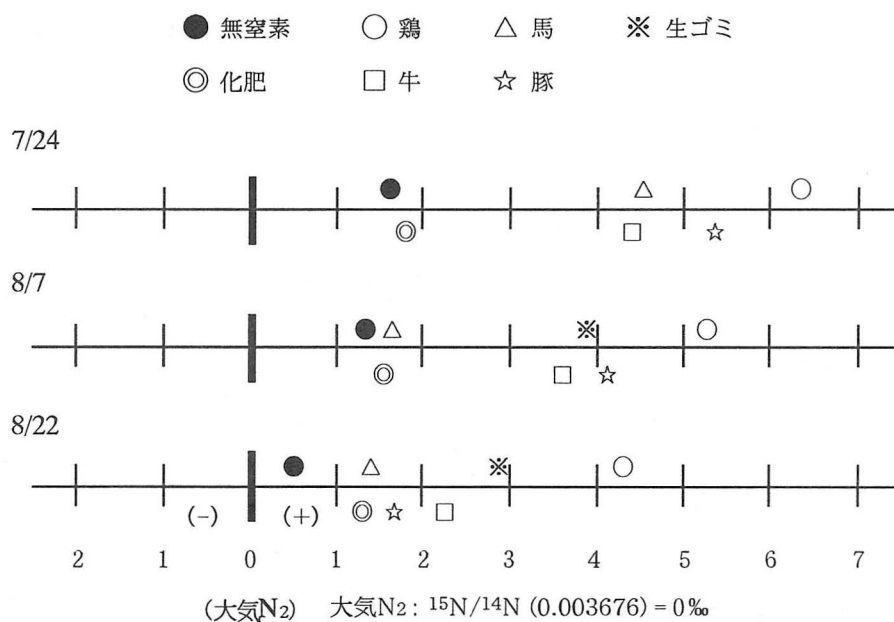


図 - 1 植物体地上部  $\delta^{15}\text{N}$ の変遷

無窒素区、化学肥料区では無機態窒素の施肥がない、あるいは少量のために早い時期から窒素同化を根粒窒素固定に依存しており、これが $\delta^{15}\text{N}$ を小さくさせたと考えられる。また馬糞区で $\delta^{15}\text{N}$ は7月24日に+4.55と高かったが2週間後に+1.70に低下したことは、窒素同化が無機態依存から根粒窒素固定に移行したためと考えられる。すなわち、2週間の間に有機物分解が進み無機態窒素が吸収同化され培地の濃度が低下したか、あるいは脱窒、溶脱などで低下したためと考えられるが、その原因は特定できなかった。牛糞、豚糞区で $\delta^{15}\text{N}$ が徐々に低下したのは有機物の分解がゆるやかであったためと考えられる。それに対して鶏糞区で早い時期から $\delta^{15}\text{N}$ が高く維持されたのは、鶏糞は分解が早く、しかもそれが長く続き培地の無機態窒素濃度が高く維持され、窒素同化が無機態窒素に依存したためと考えられる。窒素同化を無機態窒素吸収と根粒固定窒素との和とするなら、無機態窒素濃度が低い時は根粒の活性が高まることにより、根粒窒素固定が積極的に行われ、一方培地の無機態窒素濃度が高い時は根粒の活性が低く、窒素同化は無機態窒素に依存していると考えられるが、本実験の結果からはその理由を特定することはできなかった。なお、今回の実験より土壌の $\delta^{15}\text{N}$ を分析することにより窒素固定依存率を明らかにできる可能性が示された。

## まとめ

窒素源の異なる処理を設定し、ダイズ（ユキムスメ）を生育させ、 $\delta^{15}\text{N}$ を分析し、以下の結果を得た。

（1）各種形態、乾物重、収量、窒素含有率、および窒素集積量には顕著な処理間差はみられなかったが、 $\delta^{15}\text{N}$ には明瞭な差が認められた。すなわち、 $\delta^{15}\text{N}$ は鶏糞区で高く、無窒素あるいは化学肥料少量施肥区では低かった。

（2）窒素源として施用した、由来の異なる各種有機物の分解過程に差があることが示唆された。すなわち鶏糞区で生育中に無機態窒素濃度が高く維持された結果、窒素固定量が小さく、また無窒素区では窒素濃度が低かったため、窒素固定量が大きかったと考えられる。

## 最後に

本実験を実施するにあたり、窒素の安定同位体測定は技術部長はじめ多くの皆様方の理解のもとで、農学部技術部個人研修制度を利用し、広島大学大学院生物圏科学研究科にて全自動窒素・炭素質量分析計で行いました。本来ならば研修レポートを提出すべきですが、本発表で換えさせて頂きました。

## 謝辞

窒素安定同位体測定にあたり試料の調整法、測定法、ならびに分別法などを懇切丁寧に御指導いただきました広島大学大学院生物圏科学研究科藤田耕之輔教授に心より感謝申し上げます。また、同位体質量分析計を稼働するにあたり直接労をねぎらわれた同院生の甲斐義人君に厚く御礼申し上げます。

またこの実験の実施にあたり、家畜有機物および生ゴミコンポストの試料を快く提供して頂きました附属農場作物グループ、畜産グループ技官ならびに教官の皆様方に厚く御礼申し上げます。

この報告をとりまとめるにあたり、普段より暖かい援助と叱咤激励を頂きました当教室の教官ならびに院生の皆様方に感謝申し上げます。

## 参考論文

- 1) 田中明、山口淳一、藤田耕之輔 「生物学的窒素固定」 施設農業への新エネルギー利用 (株)フジ・テクノシステム p584-687
- 2) 星 忍 ダイズの窒素固定と生育・収量 「根粒の窒素固定」ーダイズの生産向上のためにー 日本土壤肥料学会編 博友社 p5-32 1982
- 3) 米山忠克 安定同位体は語る 化学と生物 Vol.26 No.3 p176-173 1988
- 4) 自然存在比の分析と応用 植物栄養実験法 博友社 p325-331 1990
- 5) 米山忠克 土壌ー植物系における炭素、窒素、酸素、水素、イオウの安定同位体自然存在比：変異、意味、利用 日本土壤肥料学誌 p252-268 1987